

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720090153563

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

影响约氏疟原虫遗传杂交的因素和有性生殖及抗药性相关性状的遗传定位

Factors affecting genetic crosses and mapping loci linked to sexual development and drug resistance phenotypes in *Plasmodium yoelii*

朱 锋

指导教师姓名: 苏新专 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 10 月

论文答辩时间: 2012 年 11 月

学位授予日期:

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2012 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（_____）课题（组）的研究成果，获得（_____）课题（组）经费或实验室的资助，在（_____）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	1
Abstract.....	3
第一章 前言	5
1.1 疟疾现状	5
1.2 啮齿类动物疟原虫	6
1.3 疟原虫及生活史	7
1.4 疟原虫配子体和蚊虫期发育及分子机理	9
1.4.1 配子体的分化形成.....	10
1.4.2 配子体在按蚊中肠内活化及分子机理.....	11
1.4.3 配子体从宿主红细胞中逸出.....	12
1.4.4 卵囊发育与宿主的免疫反应.....	14
1.5 啮齿类动物疟原虫与抗药机理	15
1.5.1 疟原虫抗药性及相关基因.....	15
1.5.2 疟原虫抗药性突变与群体环境适应.....	19
1.5.3 配子体与抗疟药物.....	21
1.6 疟疾的防治以及挑战	22
1.6.1 药物治疗.....	22
1.6.2 化学预防.....	23
1.6.3 蚊媒控制.....	23
1.6.4 疟疾疫苗.....	24
1.7 本研究的目的	24
第二章 约氏疟原虫遗传杂交及子代克隆体系优化	26
2.1 引言	26
2.2 材料方法及实验步骤:	28
2.2.1 疟原虫、按蚊、微卫星引物、PCR 体系及微卫星分型.....	28
2.2.2 虫株及 DNA 准备.....	31
2.2.3 蚊媒感染及遗传杂交.....	32

2.2.4 网织红细胞依赖型疟原虫蚊传能力恢复.....	33
2.2.5 影响遗传杂交及克隆筛选效率的因素.....	34
2.3 实验结果	35
2.3.1 网织红细胞依赖型虫株的蚊传能力恢复.....	35
2.3.2 影响遗传杂交效率的因素.....	42
第三章 约氏疟原虫遗传图谱的构建	50
第四章 约氏疟原虫配子体及卵囊发育相关性状的遗传定位	51
4.1 引言	51
4.2 材料与方法	53
4.2.1 疟原虫虫株, 微卫星分型.....	53
4.2.2 约氏疟原虫遗传杂交.....	53
4.2.3 卵囊发育表型分析.....	54
4.3 实验结果	55
4.3.1 重组克隆子代的筛选和鉴定.....	55
4.3.2 定位与卵囊发育相关的基因.....	55
4.4 讨论	67
第五章 约氏疟原虫氯喹和甲氟喹抗性相关性状的遗传定位	70
5.1 引言	70
5.2 材料与方法	72
5.2.1 疟原虫虫株、微卫星分型.....	72
5.2.2 约氏疟原虫遗传杂交.....	72
5.2.3 抗药性表型分析.....	72
5.2.4 遗传定位和统计分析.....	72
5.3 实验结果	73
5.3.1 杂交亲本对抗疟药物的敏感性.....	73
5.3.2 定位氯喹抗性相关基因.....	74
5.3.3 定位甲氟喹抗性相关基因.....	80
5.4 讨论	83

总结	84
参考文献	85
附表	95
攻读学位期间发表论文	113
致谢	114

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract (Chinese)	1
Abstract (English)	3
Chapter 1: Introduction	5
1.1 Malaria and prevalence	5
1.2 Rodent malaria parasites	6
1.3 Plasmodium and life cycle	7
1.4 Gametocyte and mosquito stage development	9
1.4.1 Gametocyte differentiation.....	10
1.4.2 Gametocyte activation in mosquito midgut	11
1.4.3 Gametocyte egress from erythrocyte	12
1.4.4 Oocyst formation and host immune responses	14
1.5 Rodent plasmodia and drug resistance	15
1.5.1 Drug resistance and candidate genes	15
1.5.2 Drug resistance mutations and environment adaptation	19
1.5.3 Gametocyte and antimalarial drugs.....	20
1.6 Malaria prevention and challenge.....	22
1.6.1 Chemotherapy.....	22
1.6.2 Chemoprophylaxis.....	23
1.6.3 Mosquito control.....	23
1.6.4 Malaria vaccine	24
1.7 Study aims1.6.4 Malaria vaccine	24
Chapter 2: genetic cross of <i>P. yoelii</i> and progeny cloning	26
2.1 Introduction	26
2.2 Materials and methods	28
2.2.1 Mice, mosquitoes, and microsatellite analysis.....	28
2.2.2 Parasites and DNA extraction	31
2.2.3 Mosquito infection and genetic crosses.....	32

2.2.4 Restoration of the ability to infect mosquitoes	33
2.2.5 Factors affecting genetic crosses and progeny cloning	34
2.3 Results	35
2.3.1 Restoration of the ability to infect mosquitoes	35
2.3.2 Factors affecting genetic crosses	42
Chapter 3: Linkage maps of <i>P. yoelii</i>.....	50
Chapter 4: Loci linked to gametocyte and oocyst development	51
4.1 Introduction	51
4.2 Materials and methods.....	53
4.2.1 Parasites and microsatellite analysis.....	53
4.2.2 Genetic crosses of <i>P. yoelii</i>	53
4.2.3 QTL analysis for oocyst phenotype	54
4.3 Results.....	55
4.3.1 Cloning and identification of recombinant progeny	55
4.3.2 Loci linked to oocyst counts	55
4.4 Discussion	67
Chapter 5: Loci linked to CQ and MQ resistance phenotype.....	70
5.1 Introduction.....	70
5.2 Materials and methods.....	72
5.2.1 Parasites and microsatellite analysis.....	72
5.2.2 Genetic cross of <i>P. yoelii</i>	72
5.2.3 Analysis for drug resistance	72
5.2.4 QTL analysis.....	72
5.3 Results.....	73
5.3.1 Drug responses of parental parasites.....	73
5.3.2 QTL analysis for CQ resistance	74
5.3.3 QTL analysis for MQ resistance	80
5.4 Discussion	83
Conclusion	84

References	85
Supplemental tables.....	95
Publications	113
Acknowledgements	114

厦门大学博硕士论文摘要库

图表索引

Index of Figures and Tables

图 1-1. 疟疾全球分布图	5
图 1-2. 啮齿类动物疟原虫来源	6
图 1-3. 疟原虫生活史	9
图 1-4. 配子体活化信号通路	12
图 1-5. 抗疟药物对恶性疟原虫晚期配子体的抑制效果	22
图 2-1. PHZ 处理小鼠红细胞密度和网织红细胞比例	36
图 2-2. 17XNL/17XNL-GFP 在盐酸苯胍干预下的生长曲线	37
图 2-3. 17XNL 在盐酸苯胍干预下的小鼠存活率	37
图 2-4. 特异性 MS 引物扩增 17XNL/17XNL-sporozoite	39
图 2-5. 17XNL/17XNLs 红内期生长曲线	40
图 2-6. 亲本比例与荧光卵囊数量的关系	44
图 2-7. 遗传杂交混合 DNA 样品 PCR 扩增	46
图 4-1. BY265 x NSM 杂交组原虫率、配子体率和卵囊数量分析	56
图 4-2. 卵囊数量的线性回归分析	57
图 4-3. 与配子体发育相关性状的遗传座位	58
图 5-1. BY265 x NSM 杂交亲本在药物条件下的原虫率情况	73
图 5-2. BY265 x NSM 杂交组氯喹抗性	74
图 5-3. 杂交子代对氯喹抗性表型	75
图 5-4. 与氯喹抗性相关性状的遗传座位	75
图 5-5. BY265 x NSM 杂交组甲氟喹抗性	79
图 5-6. 与甲氟喹抗性相关性状的遗传座位	82
表 1-1. 疟原虫抗药性相关基因	20
表 2-1. 本实验涉及虫株	29
表 2-2. 17XNL/17XNLs 遗传学鉴定所用微卫星引物	29
表 2-3. 重组子代鉴定用微卫星引物	30
表 2-4. 17XNL 蚊传能力恢复实验小鼠分组	34
表 2-5. 17XNL/17XNL-GFP 感染小鼠饲蚊后蚊胃卵囊数量	38
表 2-6. 17XNL 感染小鼠间隔 6h 饲蚊后蚊胃卵囊数量	39
表 2-7. 17XNLs 感染小鼠饲蚊后蚊胃卵囊数量	45
表 2-8. 不同虫株对蚊媒感染情况	43
表 2-9. BY265G 杂交中荧光卵囊比例	45

表 2-10. 杂交混合原虫感染早期原虫率变化	46
表 2-11. 两次克隆过程及鉴定结果	47
表 2-12. 不同杂交子代来源对克隆效率的影响	48
表 4-1. BY265 x NSM 杂交概况及获得的重组子代数	55
表 4-2. BY265 x NSM 杂交组亲本平均原虫率、配子体率及卵囊数量差异	56
表 4-3. 位于 5 号染色体 (Chr5@24.0 cM) 贡献座位上的候选基因	59
表 4-4. 位于 5 号染色体 (Chr5@4.0 cM) 贡献座位上的候选基因	62
表 4-5. 位于 13 号染色体贡献座位上的候选基因	65
表 4-6. 卵囊数量随蚊媒感染时间变化	67
表 5-1. 位于 1 号染色体贡献座位上的候选基因	75
表 5-2. 位于 9 号染色体 (Chr9@68cM) 贡献座位上的候选基因	77
表 5-3. 位于 9 号染色体 (Chr9@48cM) 贡献座位上的候选基因	77
表 5-4. 杂交子代对甲氟喹抗性表型	81

摘要

疟疾目前依然是非常严重的人类虫媒传染病。据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）2010 发布的报告，2009 年约有 78 万人死于疟疾。疟疾持续存在并广泛流行的关键在于疟原虫对抗疟药物和蚊媒杀虫剂的耐受性。同时由于我们对寄生虫与宿主反应及致病机理缺乏了解，也使得很多病人无法得到及时有效的救治。为了更好的研究疟疾的致病和抗药性的分子基础，我们建立了啮齿类疟原虫的动物模型。啮齿类疟原虫易于实验室传代保种，同时具备多种与人疟相类似的生物学表型（毒力和致死性、网织红细胞选择性、抗药性等）。这些特征使得啮齿类动物疟原虫成为疟疾研究中的重要手段。在此我们完善了约氏疟原虫遗传杂交的方法，建立约氏疟原虫微卫星遗传图谱并依托此遗传图谱来研究约氏疟原虫配子体和卵囊发育以及药物抗性等机理。

疟原虫经常会因在脊椎动物宿主内连续传代失去蚊媒感染能力而不能用于遗传杂交，本研究首先探索了一种恢复和改善网织红细胞依赖型亲本蚊传能力的实验方法，使已丧失传蚊能力的虫株能成功完成蚊期的有性增殖和发育，并产生具有感染力的子孢子。

获得大量独立的重组杂交子代是我们进行疟原虫遗传杂交分析的前提。亲本蚊传能力、杂交亲本比例以及稀释化克隆效率等因素都会影响到重组杂交子代的获得。因此，我们还研究并分析了影响杂交实验的诸多因素，从而大大提高了获得重组子代的机率。

约氏疟原虫遗传连锁图谱的建立为完成约氏疟原虫基因组序列拼接、功能基因识别和基因定位创造了条件。我们以三组约氏疟原虫遗传杂交得到的 75 个独立的重组克隆子代为基础构建了约氏疟原虫第一张高分辨率的遗传连锁图谱，将隶属于各染色体上的遗传标记聚类成 14 个连锁群，并将一些序列重叠群 contigs 精确定位到相应的染色体上。约氏疟原虫遗传重组单位为 39.7kb/cM，大于以往报道的恶性疟原虫和夏氏疟原虫遗传重组单位，这也说明约氏疟原虫重组交换率较低。

在疟原虫生活周期中，配子体介导了疟原虫从人到蚊媒的发育和增殖；针对此阶段的传播阻断疫苗可以阻断蚊媒将疟原虫从一个宿主传播到另一个宿主。因此，探究疟原虫配子体分化和卵囊发育机制将为传播阻断疫苗设计和控制疟疾传

播提供重要的理论基础。文中我们探讨了约氏疟原虫原虫率和配子体率与蚊媒传播能力(卵囊数量)的关系,并且数量性状基因座位(quantitative trait locus, QTL)分析卵囊数量表型显示染色体 5 和 13 上有三个座位与约氏疟原虫蚊媒传播能力性状相连锁。然而表型实验中远交系昆明小鼠遗传背景的差异可能使得杂交子代卵囊数量表型发生随机性偏移而影响了 QTL 分析结果,这也是我们后续的重复实验中需要改进的地方。

疟原虫抗药性的增长和扩散是当今疟疾控制中面对的重要问题。人们在疟原虫的生理特性及分子调控方面取得了很多进展,但是只鉴定出来少量几个与当前使用的药物抗性有关的基因。很多有关啮齿类动物疟原虫抗药机理还有待研究。本文分析了对药物敏感程度不同的约氏疟原虫亲本间杂交产生的 35 个重组子代的药物耐受表型,发现约氏疟原虫人工筛选的氯喹和甲氟喹抗性不能经有性生殖遗传给子代。这现象值得我们继续研究。

约氏疟原虫遗传杂交体系的完善、遗传连锁图谱的构建为我们开展约氏疟原虫基因分型,探索发育调控过程和研究抗药性提供了重要的信息和工具。

关键词: 啮齿类动物疟原虫; 基因分型; 微卫星; 遗传连锁图谱; 遗传定位; 配子体发育; 抗药性

Abstract

Malaria remains a devastating disease in the world, killing approximately ~0.78 million people a year (WHO malaria report, 2010). The problem has been exacerbated over the last decades by the emergence and spread of drug resistant parasites and pesticide resistant mosquitoes. Lack of understanding of the mechanisms of drug resistance and disease pathogenesis has prevented proper patient care and treatment. Rodent malaria parasites have been used as models for studying human malaria pathogenesis and drug resistance because they share many common features with human parasites and can be maintained easily in the laboratory animals. In this study, we investigated factors that could influence the chance of obtaining recombinant progeny from genetic crosses of *Plasmodium yoelii*, developed microsatellite linkage maps, and performed several genetic crosses to map genetic loci potentially linked to *P. yoelii* responses to chloroquine and oocyst development.

Plasmodium parasites often lose the ability to infect a mosquito after continuous *in vitro* culture (*Plasmodium falciparum*) or blood stage passages (rodent malaria parasites), and therefore, cannot be used for a genetic cross. Here we developed a novel method to restore the ability of a parasite (17XNL that could not develop in mosquitoes) to infect mosquitoes and to successfully produce infective sporozoites, making it possible to cross this parasite with other parasites.

Cloning recombinant progeny (RPs) is essential for a genetic cross. However, many factors such as differences in producing infective gametocytes and the timing of progeny cloning can greatly influence the probability of obtaining RPs. We investigated the factors that might influence the outcome of a genetic cross and developed an optimized protocol for cloning recombinant progeny from *P. yoelii* crosses. The optimized protocol greatly improves the probability of obtaining recombinant progeny from a genetic cross.

A genetic map is an essential tool for genetic mapping. We have developed a

linkage map after genotyping 75 *P. yoelii* progeny with ~600 microsatellite markers (also see our previous publication by Li et al., 2011). These markers were also used to genotype progeny in this study in our efforts to identify genes contributing to drug resistance and oocyst development.

Different parasite strains often have different infectivity in a mosquito, producing various numbers of oocysts. *P. Yoelii* nigeirensis N67 produces an average of ~350 oocysts, whereas *P. yoelii yoelii* BY265 produces much fewer oocysts. To investigate the molecular mechanism underlying the difference in oocyst count, we performed several genetic crosses using these two parasites and identified some putative genetic loci linked to the difference in oocyst count after quantitative trait loci analysis (QTL). However difference in the genetic background of individual outbred Kunming mice might interfered with parasite development in the mice, particularly gametocyte development, which might affect final oocyst counts and QTL results. Repeats using inbred mice may be necessary. We also performed genetic crosses to map genes that may play a role in parasite response to chloroquine and mefloquine and obtained 35 RPs. Unfortunately, the resistant parasite appeared to loose the resistance phenotype after passing through mosquitoes. Further investigations are necessary to dissect the mechanism leading to the gain and/or lost the drug resistant phenotypes.

Our study provides critical tools and information for genetic investigation of parasite development and drug resistance in *P. yoelii*

Key words: rodent malaria parasites; genotyping; microsatellite; genetic linkage map; genetic mapping; sexual development; drug resistance

第一章 前言

1.1 疟疾现状

疟疾是由按蚊叮咬而感染疟原虫引起的虫媒传染病。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的《2010 年世界疟疾报告》,2009 年有 2.25 亿人感染疟疾,其中约 78 万人死亡,多数为儿童和孕妇^[1](word malaria report, 2010)。英国维康基金会和世界上其它一些研究机构发起的“疟疾地图计划”(图 1-1)统计显示疟疾流行地区主要分布在非洲中部、南亚、东南亚及南美北部的热带地区。约占全球 35%的人口(23.7 亿)存在患疟疾的风险,其中有 10 亿人口居住在疟疾高风险地区;撒哈拉以南的非洲地区是目前疟疾感染最严重的地方^[2, 3],而非洲以外的感染率低于 5%。

近年来,我国疟疾防治已取得突破性进展,发病人数由 20 世纪 70 年代初的 2400 多万减少至 2010 年的 7433 例。其中间日疟 4943 例,恶性疟 1287 例,死亡 15 例^[4];重度流行区的范围大幅缩小,除云南、海南两省外,其他各省已消除恶性疟。由于非疟疾流行区居民对疟原虫免疫力较差,属于易患疟疾的高危人群,因此外出务工、经商、旅游等人口流动引起的输入性恶性疟病例比例逐年增高,且外来传染源输入引起的当地疟疾传播已成为疟疾流行的主要原因^[5, 6]。

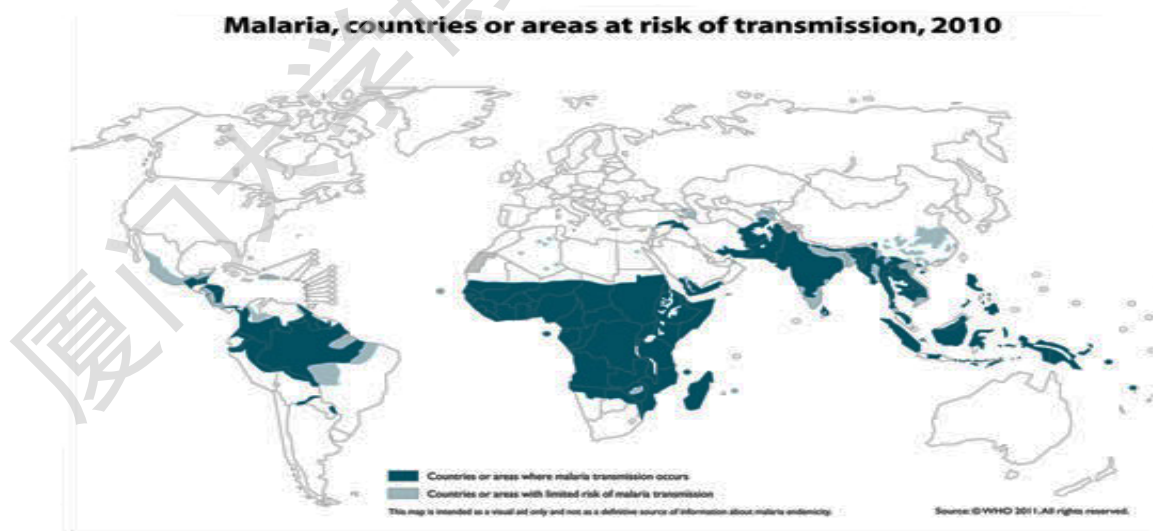


图 1-1. 疟疾全球分布图

Fig. 1-1. The global distribution of malaria (Word Health Organization, 2010).

图中深蓝、浅蓝和白色区域分别表示疟疾流行的高险区、低险区和安全区。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库